УДК.576.3/.7.086.83:612.014

Н.А. Ивличева, С.Н. Мякишева, Э.Н. Гахова
(Пущинский государственный университет, Институт биофизики клетки РАН)

НЕРВНАЯ КЛЕТКА - МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ И ЭФФЕКТИВНОСТИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Изучение механизмов криоповреждений и криозащиты а также эффективности криоконсервации является основной проблемой криобиологии (Белоус, Грищенко, 1994). Основными способами защиты клеток от воздействия повреждающих факторов являются использование для каждого типа объекта оптимальных скоростей охлаждения-оттаивания, создание криозащитных сред, применение криопротекторов (криозащитныхвеешеств).

Как известно, криопротекторы взаимодействуют с молекулами воды, солями и с компонентами мембран, тем самым оказывая влияние на процессы кристаллизации. Их применяют в составе криозащитных сред. При добавлении этих сред к клеточным суспензиям физико-химические свойства вне- и внутриклеточных растворов изменяются так, что последующие изменения при замораживании-отогреве оказываются менее губительными для клетки. Однако вещества, используемые в качестве криопротекторов, могут оказывать и токсическое действие на биологические объекты. Токсический эффект зависит от морфо-функциональных и физико-химических свойств клеток и клеточных систем, от свойств криозащитного агента, его концентрации, температурного режима и длительности контакта с клеткой, и др.

В настоящее время общепризнано, что основной мишенью действия повреждающих и защитных факторов, сопровождающих процесс криоконсервации, является клеточная мембрана (Белоус и др., 1987). Нейроны и нервы позвоночных и беспозвоночных животных благодаря свойствам клеточных мембран и хорошо отлаженным способам регистрации электрофизиологических параметров, могут быть использованы для изучения механизма действия криопротекторов, низких и сверхнизких температур. В связи с этим органотипическая, тканевая и клеточная нейрональные культуры in vitro представляют собой удобную модель для изучения криоконсервации на свойства клеточных мембран. Большое преимущество клеточных культур заключается также в возможности прижизненного анализа динамики морфологических и функциональных изменений клеток под влиянием криозащитных сред, холода и замораживания (Гахова и др., 1989; Кислов, Пластинкин, 1994; Чекурова, 1994; Ивличева и др., 2004; Сафронова и др., 1992; Мякишева и др., 2001, 2003; Гахова, Дмитриева, 2003; Pichugin et al., 2006).

Так, на изолированных нейронах пресноводного моллюска Lymnaea stagnalis L. при изучении последствий криоконсервации нами было показано, что через 30 минут после оттаивания наблюдались низкие значения мембранного потенциала (МП), входного сопротивления (RBX) И отсутствие возбудимости нейрональной мембраны. Через 2-3 часа культивирования электрические характеристики нейронов восстанавливались практически до исходных значений. Эти данные свидетельствовали как о наличии повреждений на уровне клеточных мембран вследствие замораживания, так и происходящих после оттаивания репарационных процессах и нормализации работы ионных насосов, поддерживающих ионные градиенты между клеткой и средой (Гахова и др., 1989; Gakhova et al., 1998). Высокий осмотический градиент, возникающий при оттаивании клеток и отмывании криоггротектора, является важным фактором криоповреждений. Моделирование этого процесса путем внутриклеточной перфузии растворов криопротекторов показало, что высокий осмотический градиент нарушает связь между цитоскелетом и клеточной мембраной (Kislov et al., 2000). Методом культуры in vitro нами было показано, что нейроны, выделенные из криоконсервированного мозга моллюска, сохраняют способность формировать нейриты и образуют нейрональные сети, подобные тем, что формируют нейроны, не прошедшие криоконсервацию (Ивличева и др., 2004).

Другим, на наш взгляд, удобным объектом исследований в крионейробиологии может быть нейробластома, которая относится к числу наиболее часто встречающихся форм злокачественных ново-

образований. Важно отметить, что культивируемые клетки нейробластомы при воздействии деполяризующих агентов генерируют потенциалы действия, т.е. сохраняют основную особенность нервных клеток - возбудимость клеточной мембраны. Основное достоинство клеток нейробластомы, как модели для изучения механизма действия криопротекторов и последствий криоконсервации, заключается в возможности их прижизненного анализа. Основными маркерными признаками являются морфология клетки (наличие у нее специфических нервных отростков), высокая активность ферментов, участвующих в метаболизме нейромедиаторов, электрическая возбудимость мембраны.

Изучение влияния криопротекторов на клеточные мембраны с использованием перевиваемых нейрональных культур может позволить выявить не только криозащитный эффект, но и их возможное токсическое, или стимулирующее действие.

Так например, в клетках нейробластомы некоторых перевиваемых линий мышей наиболее часто используемый криопротектор ДМСО избирательно изменяет показатели электрофизиологической и морфологической дифференцировки. При использовании ДМСО в концентрации до 2% наблюдается индукция роста отростков (Kimhi et al., 1976) и значительное уменьшение пролиферативной активности, измеренной по включению ЗН-тимидина в ядра клеток (Сафронова и др., 1992). ДМСО может оказывать существенное влияние и на электрические параметры нейрональной мембраны. Так, Сафроновой и др. (1992) методом пэтч-клямпа было показано, что ДМСО в концентрации 2% существенно влияет на значение мембранного потенциала, усиливает возбудимость мембраны и стимулирует появление новых активных типов Са-переносятщих путей.

Таким образом, использование нервной клетки в качестве модели в сочетании с электрофизиологическими методами и методом культуры in vitro позволит получать результаты, на основании которых можно будет сделать вывод об эффективности криоконсервации и защитных свойствах применяемых криопротекторов.

SUMMARY

The in vitro culture of adult mollusc neurons Lymnaea stagnalis L. and of the mouse neuroblastoma N1E-115, Clone C-1300, are considered as a model to study the effects of cryoprotectants on neuronal cellular membranes. It has been shortly presented a neuronal culture of differentiated mollusc neurons and of the mouse neuroblastoma N1E-115 and the possibility to its practical application for cryoneurobiology.

Литература:

1. Белоус А. М.,Грищенко В. И. Криобиология. 1994, Наукова думка, Киев, 432 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанои Л.Ф.. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция. Высшая школа, Москва, 1987,82 с.
3. Гахова Э.Н., Дмитриева Е.В. Криоконсервации нервной ткани. Биофизика живой клетки. 2003,7, 65-68 (http://cam.iteb.psn.ru/).
4. Гахова Э.Н., Чекурова Н.Р., Кислов А.Н., Вепринцев Б.Н. Гигантские нейроны сохраняют жизнеспособность после глубокого замораживания мозга пресноводного моллюска Lymnaea stagnalis L.. Криобиология. 1989,1,19-23.
5. Ивличева Н.А., Дмитриева Е.В., Костенко М.А., Гахова Э.Н. Криоконсервированные нейроны моллюска способны к морфологической дифференцировке в культуре in vitro. Биофизика. 2004, 49,4,710-714.
6. Мяиштева С.Н., Костенко М.А., Дриняев В.А., Мосин В.А. Пролиферация и морфологическая дифференцировка клеток нейробластомы в культуре под влиянием авермектинов. Морфология. 2001,120,6,24-26.
7 Мякишева С.Н., Костенко М.А., Сахарова Н.Ю., Хохлов А.А. Культивирование нейробластомы мыши после криоконсервации и перспективы использования ее в изучении процессов дифференцировки нервных клеток. Биофизика живой клетки. 2003,7,69-71(http://cam.iteb.psn.ru/).
8. Сафронова В.Г, Смолихина Т.И., Чемерис Н.К., Почуева Т.В., Солдатов Н.М., Дудкин СМ. Исследование рецепторов дигидропиридинов и потенциалзависимых кальциевых токов нейробластомы N1E-115: эффект клеточной дифференцировки. В сб.: Клеточная сигнализация. М., 1992, 45-51.
9. Чекурова Н.Р Использование электрофизиологического метода для изучения механизмов криоповреждений и способов криозащиты. Биофизика живой клетки. 1994,6,121-126.
10. Gakhova E.N., Kislov A.N., Chekurova NR. Study of membrane properties of mollusc neuron after freeze-storage at liquid nitrogen temperature for 8 years. Cryopreservation of testis of frog Rana temporaria. Infusionsther.Trasfusiosmed. 1997,4,5,378-379.
11. "Yuri Pichugin, Gregory M. Fahy, Robert Morin. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification. Cryobiology. 2006,52,2,228-240.